动 物 学 研 究 2003, Dec. 24 (6): 421 ~ 428 CN 53 - 1040/Q ISSN 0254 - 5853
Zoological Research

甘油浓度对蓝狐精子深低温冷冻保存的影响及冻融前后精子的超微结构

李新红[1,4]，顾孝连[2]，华修国[1]，邹兴淮[3]
（1. 上海交通大学 农业与生物技术学院，上海 201101；2. 苏州科技大学 生物系，江苏 苏州 215009；
3. 东北林业大学 野生动物资源学院，黑龙江 哈尔滨 150040）

摘要： 人工采取 8 只优质芬兰雄性蓝狐的精液，分别利用 2%、4%、6%和 8%甘油浓度的卵黄 - Tris - 果糖 - 柠檬酸钠稀释液进行稀释，制成细管冻精。在冻融后 0、0.5、2、4、6 h 检测 4 种浓度组的精子运动度、质膜完整率、顶体完整率；并利用透射电镜观察冻融前后精子的超微结构变化。冻融后 0 h，4%甘油浓度组冻融精子的运动度、质膜完整率、顶体的完整率均最高（分别为 41.8%、43.6%、48.4%），2%浓度组最低（分别为 24.5%、27.6%、31.7%）；随着检测时间延长，2%与 4%组的精子特性差异显著，但 2%、6%、8%3 个组间差异不显著；6 h 时各组间精子的运动度均不超过 10%，最高质膜完整率和顶体完整率分别为 11.8%、12.7%。说明蓝狐精液稀释剂中甘油的适宜浓度应为 4%，冻融后精子的活力维持时间较短。蓝狐精子冻融过程中质膜极易发生膨胀或断裂、顶体囊泡化或溃散，而质膜和顶体丢失现象较少。

关键词： 蓝狐；精子；低温保存；甘油；特性
中图分类号： Q959.838；Q492 **文献标识码：** A **文章编号：** 0254 - 5853(2003)06 - 0421 - 08

Effects of Glycerol Concentration on Semen Cryopreservation in Blue Foxes and Ultrastructure of Spermatozoa Subjected to the Process of Freezing-thawing

LI Xin-hong[1,4], GU Xiao-lian[2], HUA Xiu-guo[1], ZOU Xing-huai[3]
(1. *College of Agriculture & Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai* 201101, *China*;
2. *Department of Biology, Shuzhou Science & Technology University, Suzhou* 215009, *China*;
3. *College of Wildlife Resources, Northeast Forestry University, Harbin* 150040, *China*)

Abstract: Eight high quality male blue foxes from Finland were chosen for semen collection by digital manipulation and diluted with the extender Ⅰ. The diluted sperm were divided into four fractions and the same volume of the extender Ⅱ containing glycerol was added to reach the final glycerol concentration of 2%, 4%, 6%, 8% (v/v), respectively. After equilibrated for 2 h at 5 ℃. Semen samples were packed in 0.5 mL plastic straws and frozen on a rack 5 cm above liquid nitrogen and thawed at 70 ℃ for 9 s. Before and after freezing-thawing, not only the effects of different concentrations of glycerol on changes of spermatozoa characteristics but also the alterations of ultrastructure of spermatozoa by Transmission Electron Microscope were studied. The results showed, the motility and plasma membrane integrity of spermatozoa together with the percentage of intact acrosomes were related to the dose of glycerol. All these characteristics reached the highest in the fraction that the final glycerol concentration was 4% (41.8%, 43.6%, 48.4%) and the lowest appeared in the fraction of 2% (24.5%, 27.6%, 31.7%). Along with the extension of incubation, characteristics of spermatozoa in both fractions of 2% and 4% were significant differences while the differences between 2%, 6% and 8% were insignificant. After 6 hours, the motility of each fraction was not more than 10% while the highest viability and the percentage of intact acrosomes were 11.8% and 12.7% respectively. The optimum concentration of glycerol was 4% in the extenders of freezing spermatozoa for blue fox. The living time of spermatozoa subjected to the process of freezing and thawing was short. The plasma membrane was expanded extremely or broken and the acrosome was vesiculated or dis-

收稿日期：2003 - 07 - 10；接受日期：2003 - 09 - 05
基金项目：国家“948”引进资助项目（98 - 4 - 20）；上海交通大学校基金项目（A2571A）
4. 通讯作者（Corresponding author），Tel：021 - 64783852，E-mail：lixinhong7172@yahoo.com.cn

persed while plasma membrane and acrosome seldom lost.

Key words: Blue fox; Spermatozoa; Cryopreservation; Glycerol; Characteristic

蓝狐（*Alopex lagopus*）又名北极狐，其皮张是较珍贵的裘皮原料。蓝狐精子与犬科其他种类相似，冷冻过程中对低温损伤的抗性较弱，解冻后精子运动度下降，受孕率及胎仔数均低于自然繁殖（Farstad，1996）。因此在实际生产养殖中普遍采用鲜精液稀释后就人工授精的方式繁殖，并未采用冻精。国内外有关蓝狐精子深低温冷冻保存及冻精人工繁殖的研究仍处于探索阶段，尤其适宜的稀释剂、防冻剂、冷冻程序及解冻程序等是目前亟待解决的问题。

甘油广泛用于家畜精子的冷冻保护剂中，研究证实甘油对精子有毒害作用（McLaughlin et al，1992），甚至对精子膜结构也有毒害作用（Hammerstedt et al，1990），因而甘油作为保护剂的最佳浓度应该是有效协调好保护作用和毒害作用时的浓度。在不同动物精液冷冻稀释剂中甘油的添加量各不相同，甚至在犬科动物中甘油的浓度亦存在一定差异（Olar et al，1989；Fontbonne et al，1993；Peña et al，1998，2003；Hewitt et al，2001；Cardoso et al，2003）。对蓝狐而言，精液冷冻稀释剂中甘油的适宜浓度还未完全定论，有的研究者认为在2%～10%（v/v）（Hofmo & Berg，1989）；有的缩小了其范围为2%～4%（Farstad et al，1992a，b）。本文通过对蓝狐精子冻融后不同培养时间精子特性变化的研究，探讨不同浓度甘油对冻融精子的作用，从而筛选出有利于蓝狐精子冷冻保存的最佳甘油浓度；并利用透射电镜观察精子冻融前后超微结构的变化，为蓝狐人工授精繁殖机制的建立提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 精液采集

在繁殖期用手按摩法分别收集8只年龄3～5岁、具有繁殖史的优质芬兰雄性蓝狐（1999年从芬兰引进）第二次射出的精液作为样品，在37 ℃下迅速送回实验室内。在精液经纱布过滤除去胶体杂质后，立即检查精子质量。在每次收集到的多份样品中，选取运动度、质膜完整率及顶体完整率均高于95%、密度在6×10^8个/mL以上的样品进行实验。

1.2 精子冷冻

1.2.1 精液稀释 为减少蓝狐不同个体间精子特性的差异所产生的实验误差，在处理前先将采集的精液混合。混合精液在室温下300 *g* 离心10 min，弃去上清液，用稀释剂Ⅰ进行2倍体积稀释；再把稀释后的精液分成4组，每组中分别加入等体积不同甘油浓度的稀释剂Ⅱ，然后置于5 ℃冰箱内平衡2 h。调制稀释剂的pH值至接近蓝狐精液的pH值，具体成分及配方见表1（成分参考Farstad et al，1992a；果糖、柠檬酸三钠等成分的剂量为本研究组

表1 蓝狐精液冷冻稀释液的组成

Table 1 Composition of extenders for blue fox sperm freezing

成分 Component	稀释液Ⅰ Extender Ⅰ	稀释液Ⅱ Extender Ⅱ
三羟甲基胺基甲烷 Tris（g/100 mL）	2.4	—
卵黄 Egg yolk（mL/100 mL）	20	20
果糖 Fructose（g/100 mL）	3.9	3.8
柠檬酸三钠 Citric acid（g/100 mL）	1.8	—
甘油 Glycerol（9 mL/100 mL）	—	4、8、12、16②
青霉素 Penicillin（IU）	1.200.0	1.200.0
蒸馏水 Distilled water①（mL）	100.0	100.0
pH	6.80	6.80

① 蒸馏水定容100 mL；②甘油最终浓度（v/v）分别为2、4、6、8。

① Final volumes for all diluents after dissolving the ingredients are 100 mL; ② Final concentration of glycerol is 2, 4, 6, and 8 (v/v), respectively.

筛选）。药品中 Hoechst 33258 染液、CTC 染液、PVP-40 均购于美国 Sigma 公司，果糖、Tris、甘油、柠檬酸钠等其他试剂均为上海化学试剂公司产品。

1.2.2　细管冻精制备及解冻　镜检平衡后精液的密度和精子运动度，运动度保持在 90% 以上的留用。用 0.5 mL 的聚乙烯细管分装平衡后的精液，封口机封口。然后将细管水平摆放在预先准备好的细管支架（距液氮水平面 5 cm）上，盖好冷冻罐容器盖，在液氮面上熏蒸 9 s 后，迅速将细管装入液氮中保存。解冻时取 500 mL 大烧杯，倒入 70 ℃温水，取出液氮中保存的细管，在室温下停留 10 min 后，迅速置于烧杯温水中并慢慢搅动。9 s 后待精液完全溶解时，迅速取出细管，剪开两端，将精液添加到 0.5 mL、22～24 ℃的解冻液中；并将含有精液的解冻液置入 CO_2 培养箱内，37 ℃条件下培养。

随后检测精子运动度及质膜完整率。解冻液为 BTS 解冻液（Pursel & Johnsonl, 1975），但把葡萄糖改换为果糖，浓度不变。

1.3　精液的固定

分别取鲜精液及不同甘油浓度稀释剂冻融后的精液各 0.5 mL，300 *g* 再次离心 10 min，并去上清液。其沉淀分别加入 2 mL 2.5% 的戊二醛固定液（0.1 mol/L 二甲申酸盐缓冲液，pH 7.4）固定，5 ℃条件下避光保存以备检测。

1.4　电镜样品的制备及检测

所有电镜样品的制备过程均与 Hofmo & Berg（1989）方法相似，但在 300 *g*、5 ℃条件下离心，以防精子膜结构的机械损伤。样品用 2% 锇酸双重固定，经脱水、渗透后，Epon 812 树脂包埋，ULTRACUTE 型切片机（钻石刀）切片，日本产 H-600 型 TEM 观察精子结构。

1.5　冻融前后精子质量测定

1.5.1　精子运动度的测定　在冻融精子培养 0、0.5、2、4、6 h 时，分别取各实验组中的冻融精液 50 μL 放入 1 mL 孵育液中，在 37 ℃下孵育 5 min。从中再取 20 μL 滴在保温 37 ℃的血细胞计数板上，盖上盖玻片，在 40 倍相差显微镜下观察 6 个视野，重复 5 次，每次检测 200 个精子并计算精子运动度（直线加曲线运动的精子占全部精子的百分率）。

1.5.2　精子质膜完整率及顶体完整性的检查　采用 CTC-Hoechst 33258 活体荧光染料联合染色法检测精子质膜完整率及顶体完整率（Harayama et al, 2000）。取出 50 μL 精液用 1 mL 孵育液稀释后，在 37 ℃下孵育 20 min。取 200 μL 精子悬浮液与 196 μL PBS 相混合，然后加入 4 μL Hoechst 33258 染液。混匀后避光室温染色 3 min。在 1.5 mL 离心管中放入 1 mL 3% 的 PVP-40 溶液，再把染色精液轻轻铺在 PVP-40 溶液上，500 *g* 离心 6 min，去上清液。取 200 μL PBS 悬浮离心后沉淀下来的精液，再加入 200 μL CTC（750 μm），混匀后闭光孵育 30 s。然后，再加入 36 μL 12.5% 的多聚甲醛溶液，混匀。取 15 μL 精子悬液，加入等量增光剂，混匀后加盖片，用无色指甲油封片，避光保存并尽快用荧光显微镜观察记数。Hoechst 33258 染色呈阳性的死精子头部呈蓝色荧光，活精子不发光。CTC 荧光染料能着色精子顶体，根据精子头部亮黄绿色荧光的有无及亮暗程度，头部出现亮黄绿色荧光的精子为顶体完整的精子。用血细胞计数器计数 200 个精子，重复 5 次，计算精子质膜完整率和顶体完整率。

2　结果与分析

2.1　不同甘油浓度稀释液对解冻后蓝狐精子运动度、质膜完整率及顶体完整率变化的影响

冻融后不同检测时间、不同甘油浓度稀释液中精子的特性不同（表 2）。冻融后 0 h 时：4% 甘油浓度组的精子运动度、质膜完整率、顶体完整率均最高（41.8%、43.6%、48.4%），2% 浓度组的最低（24.5%、27.6%、31.7%），两组间均差异极显著（$P < 0.01$）；此外，除了 2% 与 6% 浓度组精子质膜完整率差异显著（$P < 0.05$）外，其他各浓度组间精子特性无显著差异。随着检测时间延长，各组精子特性的数值均有不同程度的减少。2 h 时：2% 与 4% 浓度组精子特性的差异显著（$P < 0.05$），其他浓度组间差异不显著。6 h 时：4% 浓度组冻融精子运动度、质膜完整率及顶体完整率显著高于其他浓度组，而其他 3 个组差异不显著；所有组具有运动度的精子均不超过 10%，最高质膜完整率（11.8%）和顶体完整率（12.7%）也较低。

2.2　冻融后蓝狐精子头部膜结构的变化

TEM 镜下未冻融的精子质膜完整，外缘较光滑，可延伸到赤道段直接与顶体后帽相连，无膨胀现象；顶体内外膜清晰，顶体完整，顶体内容物、尾部线粒体外鞘及核电子致密度较高（图 1、2）。冻融后（0 h）精子头部质膜、顶体结构发生不同程度的改变，有以下几种类型：①质膜单独膨胀，较

表 2 5 种培养时间 4 种甘油浓度冻融精子的运动度、质膜完整率及顶体完整率（%）[1]

Table 2 Motility, plasma membrane integrity and acrosome integrity values (%) (Mean ± *SD*) of semen frozen with different glycerol concentration (v/v) and immediately incubated for 0, 0.5, 2, 4 and 6 h after thawing at 37 ℃[1]

特性 Characteristics	培养时间 Incubation time (h)	甘油浓度 Glycerol concentration (%, v/v)			
		2	4	6	8
运动度	0	24.5 ± 8.1^{Ab}	41.8 ± 7.7^{B}	34.6 ± 6.2^{ab}	30.2 ± 7.3^{ab}
Motility	0.5	19.9 ± 6.5^{a}	37.5 ± 9.4^{b}	29.3 ± 8.5^{ab}	27.4 ± 10.7^{ab}
	2	17.8 ± 5.3^{a}	31.8 ± 8.6^{b}	25.8 ± 6.5^{ab}	20.4 ± 5.1^{ab}
	4	7.2 ± 4.8^{a}	18.9 ± 3.7^{b}	13.4 ± 3.7^{ab}	9.4 ± 4.3^{ab}
	6	3.9 ± 2.2^{a}	9.7 ± 2.6^{b}	4.9 ± 2.0^{a}	3.6 ± 1.5^{a}
质膜完整性	0	27.6 ± 6.8^{Aa}	43.6 ± 9.4^{B}	35.7 ± 8.6^{b}	32.4 ± 8.2^{ab}
Plasma membrane integrity	0.5	23.7 ± 8.7^{A}	38.4 ± 8.5^{B}	31.5 ± 9.4^{b}	29.3 ± 8.0^{b}
	2	19.5 ± 6.5^{a}	32.6 ± 7.5^{b}	25.4 ± 6.8^{ab}	22.0 ± 4.5^{ab}
	4	9.9 ± 4.5^{A}	21.4 ± 5.4^{B}	13.8 ± 2.5^{b}	10.4 ± 3.3^{b}
	6	4.5 ± 2.4^{a}	11.8 ± 4.2^{b}	5.7 ± 2.7^{a}	4.7 ± 2.8^{a}
顶体完整率	0	31.7 ± 7.3^{Aa}	48.4 ± 10.6^{Bb}	42.8 ± 12.4^{ab}	35.5 ± 9.2^{ab}
Acrosome integrity	0.5	28.4 ± 8.1^{a}	43.2 ± 9.7^{b}	39.3 ± 8.6^{ab}	36.7 ± 8.9^{ab}
	2	21.6 ± 6.5^{a}	35.8 ± 7.3^{b}	29.2 ± 9.4^{ab}	25.1 ± 6.7^{ab}
	4	14.4 ± 5.9^{a}	24.8 ± 7.8^{b}	20.8 ± 8.4^{ab}	16.8 ± 7.1^{ab}
	6	7.4 ± 2.7^{a}	12.7 ± 3.5^{b}	10.3 ± 3.8^{a}	8.8 ± 2.9^{a}

[1] $n = 5$。One-way ANOVA，*F* 检验：在同一横行中，上标小写字母不相同者差异显著（$P < 0.05$）；大写字母不同者差异极显著（$P < 0.01$）。

[1] Data were analyzed by *F*-tests analysis of ANOVA procedure from SAS. In each row, different lowercase in superscript showed significant differences ($P < 0.05$) and different uppercase showed extremely significant differences ($P < 0.01$).

完整，未产生囊泡和断裂；顶体及其内外膜无变化（图 3）。②顶体膨胀，外膜出现囊泡且有轻微破裂；顶体前端严重膨胀，完全与质膜相融合；赤道段附近的顶体外膜相对完整；顶体电子致密程度减弱；覆盖于核被膜上的顶体内膜完整（图 4）；③质膜极度膨胀，边缘未断裂；顶体外膜完全消失，顶体溃散呈囊泡状；顶体内膜相对完整或产生囊泡（图 5、6、7）。④质膜断裂或消失；顶体外膜完全囊泡化且囊泡分布不对称。⑤内膜相对较完整（图 8、9）。⑥内膜出现囊泡或完全消失（图 10、11）。⑦顶体赤道段发生膨胀，膨胀之处表现为内膜与核相脱离，而顶体赤道段内外膜均完整，分别与顶体头部内外膜相连，连接处外膜膨胀与内膜相分离的痕迹清晰可见（图 8、10）。其中③、④为较常见类型。说明蓝狐精子冻融后质膜极易发生膨胀或断裂、顶体囊泡化或消失现象。

2.3 冻融后蓝狐精子尾部膜结构的变化

冻融后蓝狐精子尾部结构变化主要有以下几种情况：①尾部中段线粒体内电子致密度降低，而且有“空白”段出现，线粒体结构也模糊（图 13）；②尾部中段线粒体鞘外质膜极度膨胀，囊泡化程度较严重（图 14、15）；③尾部出现扭曲、肿胀、质膜破裂或损伤脱落等多种现象，螺旋线粒体裸露（图 16、17、18）。

3 讨 论

3.1 甘油浓度及冻融后培育时间对精子特性的影响

Hammerstedt et al (1990)、Farsted et al (1992a) 认为甘油在稀释液中的最终浓度范围为 2%～4%（v/v）足以能够保护精子细胞，并且能够在快速冷冻过程中将毒性作用减少到最小；甘油浓度过高，容易产生渗透损伤。本文的结果锁定了甘油浓度的适宜浓度：无论是冻融精子的运动度、质膜完整率，还是顶体的完整性，均为 4%浓度组最高，2%最低。说明蓝狐精液冷冻稀释液中不同甘油浓度所起的保护作用不同。Concannon & Battista(1989)认为用冷冻的犬科动物精子人工授精，



p
AC
AES
1
A
MS
2
p
OAM
3
OAMV
p
4
p
AV
5
p
AV
IAM
6
p
AV
7
p
AV
AES
8
p
IAM
9

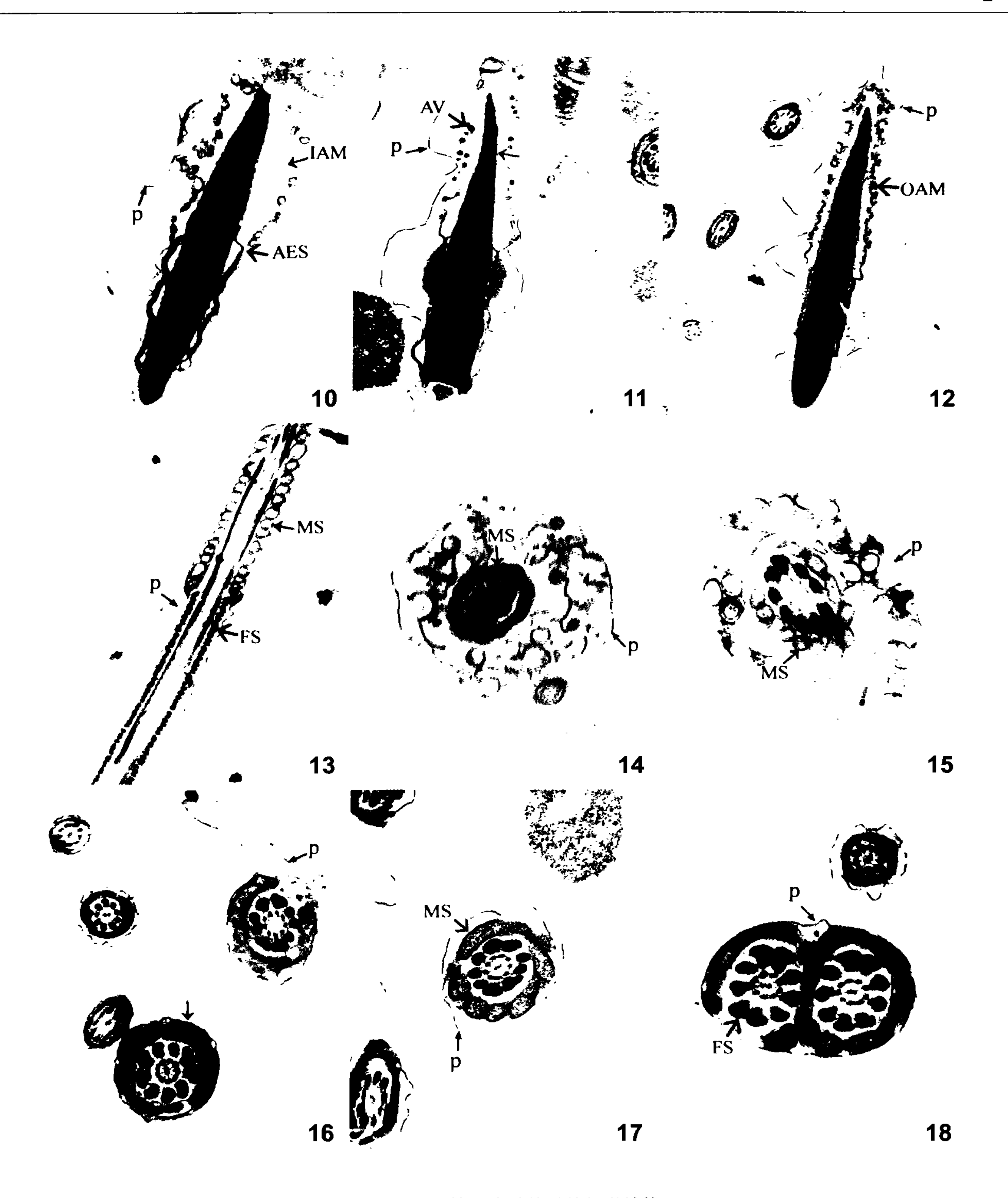


图 1～18 蓝狐精子冻融前后的超微结构

Figs. 1－18 Ultrastructrue of spermatozoa subjected to the process of freezing-thawing in blue fox

A：顶体（Acrosome）；AC：顶体帽（Acrosomal cap）；AES：顶体赤道段（Acrosome equatorial segment）；AV：顶体囊泡（Acrosome vesicle）；C：中心粒（Centrioles）；FS：纤维鞘（Filament sheath）；IAM：顶体内膜（Inner acrosome membrane）；IAMV：顶体内膜囊泡化（Inner acrosome membrane vesiculated）；MS：线粒体鞘（Mitochondrial sheath）；OAM：顶体外膜（Outer acrosome membrane）；OAMV：顶体外膜囊泡化（Outer acrosome membrane vesiculated）；P：质膜（Plasmalemma）。

1～2：精子冻融前（Sperm before freezing and thawing）；3～18：精子冻融后（Sperm after freezing and thawing）。

1．纵切面，示 P、AC、AES（箭头）[Longitudinal section，showing P，AC，AES（arrow）] ×8 500
2．纵切面，示 A、C、MS（箭头）[Longitudinal section，showing A，C，MS（arrow）] ×10 000
3．P 膨胀，A 未发生变化，OAM 完整（箭头）[P expanded，A not changed，OAM intact（arrow）] ×8 000
4．P 未膨胀，A 肿胀，OAM 不连续且囊泡化（箭头）[P not expanded，A distended，OAM discontinuous and vesiculated（arrow）] ×12 000
5．P 高度膨胀，OAM 消失，A 形成囊泡（箭头）[P highly expanded，OAM lost，A vesiculated（arrow）] ×13 000
6，7．P 高度膨胀，OAM 消失，A、IAM 囊泡化（箭头）[P highly expanded，OAM lost，A and IAM vesiculated（arrow）] ×14 000
8．P 膨胀断裂，OAM 消失，A 形成囊泡，AES 膨胀（箭头）[P expanded and broken，OAM lost，A vesiculated，AES expanded（arrow）] ×10 000
9．P 断裂，OAM 消失，AV 扩大，IAM 较完整（箭头）[P broken，OAM lost，AV extended，IAM intact（arrow）] ×12 000
10．P 断裂，AV 与细胞表面相脱离，IAM 囊泡化，AES 膨胀（箭头）[P discontinuous，AV detached from the cellular surface，IAM vesiculated，AES expanded（arrow）] ×13 000
11．P 断裂或消失，IAM 消失（箭头）[P broken or lost，IAM lost（arrow）] ×11 000
12．P 断裂，OAM 囊泡化（箭头）[P broken，OAM vesiculated（arrow）] ×10 000
13．尾部中段和主段纵切面，示 P、FS、MS（箭头）[Longitudinal sections of middle and principal pieces in caudal end，showing P，FS，MS（arrow）] ×15 000
14，15．尾部中段横切面，示极度膨大的 P、MS（箭头）[Transverse section of middle piece in caudal end，showing highly extended P，MS（arrow）] ×16 000
16，17．尾部中段横切面，示膨大或断裂的 P、正常中段横切面（箭头）[Transverse section of middle piece in caudal end，showing extended or broken P，normal transverse section of middle piece in caudal end（arrow）] ×18 000
18．两精子尾部的横切面，示 P、FS（箭头）[Transverse sections of caudal end in two sperms，showing P，FS（arrow）] ×21 000

精子活力至少为 40%～50% 才能成功；而 Linde-Forsberg & Forsberg（1989）报道冷冻的精子活力在 20%～30%就可以受孕。本研究的稀释液以卵黄－Tris－果糖－柠檬酸钠为基础，没有其他防冻成分，4%甘油浓度组精子解冻后运动度（41.8%）、质膜完整率（43.6%）、顶体完整率（48.4%）均已达到上述犬科动物人工繁殖的要求，所以 4%甘油浓度为蓝狐精液冷冻稀释液中的适宜浓度。

Ström et al（1997）的研究表明犬科动物精子对冷冻损伤的抗性较弱，冻融后精子的活力不能维持很长时间。本研究冻融后的精子在 37 ℃条件下培养 6 h 再检测时，所有组具有运动度的精子均不超过 10%，与 Tsutsui et al（2000）报道的犬冻融精子运动度结果相类似。这也可能是蓝狐冻精受精率低的原因之一。目前研究已证实犬类精子冷冻过程中甘油的适宜浓度还可能与稀释液中其他成分、冷冻速率、冷冻－解冻程序及甘油的温度有关（Li et al，2002），但主要取决于精子自身的种类。

3.2 冻融后精子超微结构的变化及其原因

Hofmo & Berg（1989）研究了蓝狐精子冻融过程中膜损伤的结果，将冻融后精子膜结构分为 3 种类型：第 1 类是质膜出现微小变化，顶体外膜有囊泡及破裂；第 2 类是顶体外膜囊泡扩大，质体膜扩张接近赤道段；第 3 类是质膜及顶体全部丧失。3 种类型中第 2 种为常见类型。本研究结果与 Hofmo & Berg（1989）报道的结果有所不同：①质膜膨胀而顶体未发生变化；②质膜无变化而顶体外膜出现囊泡；③很少出现质膜和顶体消失。TEM 下前两种类型占有一定比例。其原因可能是稀释液及冷冻—解冻程序的差异所致。Hofmo & Berg（1989）研究中所使用的甘油含量相对较高（8%），可能会对精子膜结构产生损害；本研究精液离心在 300 *g* 条件下进行，而 Hofmo & Berg（1989）是在 1 000 *g* 下进行，从而导致质膜、顶体全部丧失。

精子在冻融过程中细胞膜结构会发生不可逆的物理及化学变化(Paulenz，1993)：精子受到冷冻损伤后，质膜的流动性减弱，而通透性增强，进而发生顶体损伤、顶体内外膜游离、顶体酶释放等。这些变化均降低了精子的活力和受精能力(Hammersted et al，1990)。因此，在精子冻融过程中，选择有利于稳固膜结构的稀释防冻剂至关重要。蓝狐冻融精子质膜明显肿胀或断裂，顶体外膜囊泡化及顶体内容物溃散，与哺乳动物精子获能后发生顶体反应的结构十分相似，即所谓“假顶体反应”(Chen et al，1992；Qin et al，1995)，但二者之间结构变化的机理是否完全相同，还有待进一步研究。

参考文献：

Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM. 2003. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations [J]. *Theriogenology*, **59**: 743-751.

Chen DY, Song XF, Duan CW, Meng L. 1992. Formation of acrosome membrane vesicles in mammalian spermatozoa [J]. *Acta Zoologica Sincia*, **38** (1): 60-63. [陈大元，宋祥芬，段崇文，孟 励. 1992. 几种哺乳动物精子顶体膜囊泡形成的研究. 动物学报, **38** (1): 60-63.]

Concannon PW, Battista M. 1989. Canine semen reezing and artificial insemination [A]. In: Kirk RW. Current Veterinary Therapy [M]. Philadelphia: W. B. Saunders Company.

Farstad W. 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes [J]. *Animal Reproduction Science*, **42**: 251-260.

Farstad W, Fougner JA, Torres CG. 1992a. The effect of sperm number on fertility in blue fox vixens (*Alopex lagopus*) artificially inseminated with frozen silver fox (*Vulpes vulpes*) semen [J]. *Theriogenology*, **37**: 699-711.

Farstad W, Fougner JA, Torres CG. 1992b. The optimum time for artificial insemination of blue fox vixens (*Alopex lagopus*) with frozen-thawed semen from silver foxes (*Vulpes vulpes*) [J]. *Theriogenology*, **38**: 853-865.

Fontbonne A, Badinand F. 1993. Studies on freezing dog spermatozoa: Effect of glycerol on motility after thawing [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **47** (suppl.): 531-532.

Hammerstedt RH, Gradam JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive [J]. *J. Androl.*, **11**: 73-88.

Harayama H, Miyake M, Kato S. 2000. Role of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and serum albumin in head-to-head agglutination of boar spermatozoa [J]. *Reprod. Fertil. Dev.*, **12**: 307-318.

Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GCW. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm [J]. *Animal Reproduction Science*, **67**: 101-111.

Hofmo PO, Berg KA. 1989. Electron microscopical studies of membrane injuries in blue fox spermatozoa subjected to the process of freezing and thawing [J]. *Cryobiology*, **26**: 124-131.

Li XL, Si W, Wang H, Zou RJ, Ji WZ. 2002. Function of sugars during cryopreservation of rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa [J]. *Zool. Res.*, **23** (3): 205-209. [李喜龙，司维，王 红，邹如金，季维智. 2002. 糖在猕猴精子低温保存过程中的作用. 动物学研究, **23** (3): 205-209.]

Linde-Forsberg C, Forsberg M. 1989. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh or frozen semen [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **39**: 299-310.

Mclaughlin EA, Ford WCL, Hull MGR. 1992. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg-yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **95**: 749-754.

Olar TT, Bowen RA, Pickett BW. 1989. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws [J]. *Theriogenology*, **31**: 451-461.

Paulenz H. 1993. Spermiemembranens struktur og funksjon I relasjon til kuldesjokk (The structure and function of the sperm membrane in relation to cold shock) [J]. *Norw. J. Vet. Med.*, **105**: 1135-1142.

Peña AI, Barrio F, Quintela LA, Herradon PG. 1998. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity [J]. *Theriogenology*, **50**: 163-174.

Peña AI, Lugilde LL, Barrio M, Herradon PG, Quintela LA. 2003. Effects of equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca^{2+} concentration of dog spermatozoa [J]. *Theriogenolog*, **59**: 1725-1739.

Pursel VG, Johnson LA. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentration semen and a new thawing procedure [J]. *J. Anim. Sic.*, **40**: 99-102.

Qin PC, Tan JH, Wu GM, Xu LB, Yang QZ. 1995. Ultrastructural studies on capacitation and acrosome reaction of pig spermatozoa *in vitro* [J]. *Acta Zoological Sincia*, **41** (2): 207-212. [秦鹏春，谭景和，吴光明，徐立滨，杨庆章. 1995. 猪精子体外获能与顶体反应的超微结构研究. 动物学报, **41** (2): 207-212.]

Ström B, Rota A, Linde-Forsberg C. 1997. *In vitro* characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation [J]. *Theriogenology*, **48**: 247-256.

Tsutsui T, Hase M, Hori T, Ito T, Kawakami E. 2000. Effects of Orvus ES Paste on canine spermatozoal longevity after freezing and thawing [J]. *J. Vet. Med. Sci.*, **62**: 533-535.